

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 382**

21 Número de solicitud: 201330821

51 Int. Cl.:

**C08L 67/04** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**04.06.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.12.2014**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**Serrano, nº 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**DINJASKI, Nina;  
GARCÍA LÓPEZ, José Luis y  
PRIETO JIMÉNEZ, Mª Auxiliadora**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **USO DE POLIHIDROXIACILTIOALCANOATOS COMO BACTERICIDAS**

57 Resumen:

Uso de Polihidroxiaciltioalcanoatos como bactericidas. La presente invención se refiere al uso de polihidroxiaciltioalcanoatos, hidrolizados de estos, productos aislados del hidrolizado o composiciones que comprenden estos elementos como bactericidas. Además la presente invención se refiere al uso de estos elementos para la elaboración de medicamentos, preferiblemente bactericidas, la fabricación materiales bactericidas o recubrimiento de materiales.

Uso de Polihidroxiaciltoalcanoatos como bactericidas**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se encuadra dentro del Área de la Biotecnología en los sectores de la Industria Química, de la Industria Farmacéutica y de la Industria Alimentaria, entre otras. Específicamente la presente invención se refiere al uso de polihidroxiaciltoalcanoatos, hidrolizados de estos, productos aislados del hidrolizado o composiciones que comprenden estos elementos como bactericidas.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Los polihidroxiaciltoalcanoatos (PHA), conocidos comúnmente como “bioplásticos”, son polímeros biodegradables que se acumulan en forma de gránulos en el interior celular de algunas bacterias. Los bioplásticos son por consiguiente biopolímeros sintetizados a partir de fuentes renovables, que pueden ser biodegradados en condiciones controladas y que presentan características físico-químicas similares a las de los plásticos derivados de la industria petroquímica (Madison y Huisman, 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53) Dado que los PHA no son tóxicos y son biodegradables y biocompatibles, estos compuestos tienen un gran potencial para múltiples aplicaciones debido a su posible uso como biomateriales.

Los PHA se clasifican en dos tipos principales de acuerdo a su estructura química: los PHA de cadena corta (scl-PHA, del inglés “*short chain length PHA*”) obtenidos a partir de monómeros con 4 ó 5 átomos de carbono y los de cadena media (mcl-PHAs del inglés “*medium chain length PHA*”) procedentes de monómeros con entre 6 y 14 átomos de carbono. Los diferentes PHA identificados hasta la fecha son polímeros lineales compuestos de 3-hidroxiácidos grasos exclusivamente de la configuración *R* (RHA). El peso molecular de estos polímeros varía entre 50.000-1.000.000 y su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le confiere al polímero el carácter quiral (Prieto *et al.* 1999. *J. Bacteriol.* 181: 858-868). Las propiedades físico-químicas de los PHA abarcan desde rígido y cristalino a lo flexible, amorfo y elastomérico, en función de su composición monomérica y de la longitud de la cadena lateral del polímero.

35

La síntesis de nuevos PHAs es de gran interés, ya que los nuevos biopolímeros, así como los monómeros que los componen, con nuevas propiedades físico-químicas, tienen potencialmente una enorme utilidad para la industria. En este sentido se ha descrito recientemente un proceso de obtención de un nuevo PHA denominado PHACOS que tiene una composición monomérica nueva, ya que contienen monómeros con grupos tioéster en la cadena lateral que les confieren nuevas propiedades físico-químicas y permiten su posterior modificación química (Fernández Escapa, I, Morales Ruiz, MV, García López JL, Prieto Jiménez MA 2010. Síntesis de polihidroxialcanoatos (PHA) con grupos tioésteres en la cadena lateral. Patente Española Nº P201031401; Escapa *et al.* 2011. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89: 1583–1598). Los monómeros de los PHACOS son ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos, como el ácido (*R*)-3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico o el (*R*)-3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico. El grupo acetiltioéster de la cadena lateral de los PHACOS supone la ventaja de que facilita su modificación química, lo cual implica que el PHA modificado tendrá nuevas propiedades, que proporcionan nuevas aplicaciones y/o mejoras en las mismas.

Una de las posibles propiedades requeridas para algunos materiales de uso clínico o alimentario entre otras, es su capacidad para actuar como materiales bacteriostáticos o bactericidas de tal manera que los objetos, embases o dispositivos contruidos con estos materiales puedan evitar la proliferación de las bacterias (propiedad bacteriostática) o puedan incluso provocar la destrucción de las bacterias (propiedad antibacteriana o bactericida). Los polímeros antimicrobianos representan una clase de biocidas que se ha vuelto cada vez más importante como una alternativa a los biocidas existentes y en algunos casos incluso a los antibióticos (Siedenbiedel y Tiller. 2012. *Polymers* 4: 46-71).

Se pueden distinguir tres tipos generales de polímeros antimicrobianos: biocidas poliméricos, polímeros biocidas y polímeros liberadores de biocidas. Los biocidas poliméricos son polímeros que constan de unidades de repetición bioactivas, es decir, los polímeros son múltiples biocidas interconectados, que actúan de manera similar a los monómeros. No siempre, la polimerización de monómeros biocidas conduce a polímeros antimicrobianos activos, ya sea, debido a que los polímeros son insolubles en agua o las funciones biocidas no llegan a su destino. Los polímeros biocidas son usualmente macromoléculas cargadas positivamente que interactúan con las células microbianas que generalmente llevan una carga negativa neta en la superficie debido

a sus proteínas de membrana, a los ácidos teicoicos en las bacterias Gram-positivas, y a los fosfolípidos cargados negativamente en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Siedenbiedel y Tiller, 2012. *Polymers* 4: 46-71).

- 5 Desde 1965 se conocen los polímeros antimicrobianos, cuando se describió que polímeros y copolímeros sintéticos preparados a partir de 2-metacriloxitropononas mataban bacterias (Cornell y Donaruma, 1965. *J. Med. Chem.* 8: 388-390). En la última década el número de polímeros aprobados por la FDA como de desinfectantes ha aumentado significativamente, lo que indica la necesidad de alternativas a los
- 10 antibióticos y a los desinfectantes ambientalmente problemáticos. En este sentido se ha descrito la síntesis de compuestos que son inherentemente antimicrobianos. Por ejemplo los polímeros catiónicos han sido uno de los focos de atención (Waschinski y Tiller, 2005. *Biomacromolecules* 6: 235-243) incluyendo los que contienen amonio (Kenawy *et al.*, 2002. *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* 40: 2384-2393), sales de fosfonio
- 15 (Popa *et al.*, 2003. *React. Funct. Polym.* 55: 151-158), sales de piridinio (Tashiro, 2001. *Macromol. Mater. Eng.* 286: 63-87; Worley y Sun, 1996. *Trends Polym. Sci.* 4: 364-70), poliguanidinas y polibiguanidinas (Albert *et al.*, 2003. *Biomacromolecules*, 4: 1811-1817), polilisina (Hancock y Chapple, 1999. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317-1323), poliacrilatos (Kenawy *et al.*, 1998. *Controlled Release* 50: 145-152),
- 20 poliestirenos (Gelman *et al.*, 2004. *Org. Lett.* 6: 557-560) y polioxazolininas (Waschinski *et al.*, 1998. *Macromol. Biosci.* 5: 149-156).

El diseño de polímeros que imitan las estructuras complejas y las propiedades biológicas de las proteínas ofrece alternativas atractivas para la síntesis de péptidos

25 naturales con actividad antibacteriana (Rennie *et al.*, 2005. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 296-300).

Se ha postulado que las largas cadenas de alquilo unidas a una cadena de polímero son capaces de penetrar en las membranas celulares de las bacterias (Tiller *et al.*,

30 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 5981-5985). Por otro lado la membrana de la célula bacteriana cargada negativamente juega un papel importante en su interacción con las sales de amonio cuaternario (Tashiro, 2001. *Macromol. Mater. Eng.* 286: 63-87). Cuando las sales de amonio electrostáticamente cargadas son adsorbidas en la pared de la célula en combinación con las cadenas de alquilo que penetran la pared celular

producen fugas de contenido citoplásmico que finalmente inducen la muerte celular (Adelmann *et al.*, 2009. *Europ. Polym. J.* 45: 3093–3107).

Por otro lado, es conocido que algunos biopolímeros de origen natural son capaces de actuar como bacteriostáticos o antibacterianos. Por ejemplo, es conocido que los quitosanos tienen actividad antibacteriana sobre bacterias Gram-positivas y se ha pensado en utilizar estos quitosanos como conservantes para aditivos alimentarios. (No *et al.*, 2002. *Int. J. Food. Microbiol.* 74: 65-72; Liu *et al.*, 2001. *J. Appl. Polym. Sci.* 79: 1324-1335; Wang y Chen, 2005. *J. Appl. Polym. Sci.* 98: 391-400; Shaban *et al.*, 2002. *Nahrung/Food* 46: 337-340). Se han sintetizado también películas de quitosano y almidón con actividad antibacteriana (Durango *et al.*, 2006. *Packag. Technol. Sci.* 19: 55-59). Se han estudiado también las propiedades antibacterianas y biodegradables de los polihidroxialcanoatos intercalados con quitosanos y quitooligosacaridos a través de tratamiento con ozono (Hu *et al.*, 2003. *J. Appl. Polym. Sci.* 88: 2797–2803).

También es conocido que algunos de estos biopolímeros se pueden modificar con sustancias antibióticas y en este sentido se han preparado derivados de quitosanos modificados con sulfanilamidas que presentan actividad antifúngica (Zhong *et al.*, 2007. *Carbohydr. Res.* 342: 2390-2395).

Por otra parte se sabe que las bacterias del género *Staphylococcus* y en particular la especie *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias que más infecciones causan en humanos. La capacidad de esta bacteria para crear biofilms (biopelículas) sobre distintas superficies es una de las razones de su persistencia, por lo que se han estudiado diferentes estrategias con el uso de antibióticos para evitar la formación de estas biopelículas en catéteres e implantes (Kiedrowski y Horswill, 2011. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1241: 104–121). Se ha estimado que las biopelículas están asociadas con 65% de las infecciones nosocomiales siendo *S. aureus* y *Escherichia coli* los organismos más comunes (Mah y O'Toole, 2001. *Trends Microbiol.* 9: 34-39).

Se conocen varios polímeros antibacterianos selectivos frente a *S. aureus*. Los polímeros catiónicos como los polinorbornenos (Lienkamp *et al.*, 2008. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 9836–9843), oligolisinas (Epand *et al.*, 2009. *Biophys. J.* 97: 2250–2257) y quitosanos (Raafat *et al.*, 2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3764–3773) muestran actividad selectiva frente a *S. aureus*. Aunque las estructuras químicas de estos

polímeros son bastante diferentes unos de otros, la funcionalidad catiónica parece ser el factor determinante de la actividad contra *S. aureus* (Kuroda y Caputo, 2013. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 5: 49–66). Recientemente, también se ha demostrado que las polietileniminas también son polímeros antimicrobianos con actividad selectiva  
 5 contra *S. aureus* (Gibney *et al.*, 2012. *Macromol. Biosci.* 12: 1279–1289).

Hasta el momento existen muy pocos estudios sobre la formación de biopelículas en los PHAs. Por ejemplo se ha estudiado la influencia en la formación de biopelículas bacterianas de la presencia de impurezas en los *mcl*-PHAs formados por monómeros  
 10 con cadenas de ácido octanoico (PHO) o de ácido undecanoico (PHUA) (Mauclaire *et al.*, 2010. *Biointerfaces* 76: 104–111). La eliminación de las impurezas en el recubrimiento del biopolímero limita drásticamente la formación de las biopelículas (Mauclaire *et al.*, 2010. *Biointerfaces* 76: 104–111). Se ha encontrado que la formación de biopelículas en estos PHAs varía dependiendo tanto de la cepa bacteriana como de  
 15 la calidad del material que soporta la formación del biopelícula (Mauclaire *et al.*, 2010. *Biointerfaces* 76: 104–111). *E. coli* se une mejor a los *mcl*-PHA que *S. aureus* (Mauclaire *et al.*, 2010. *Biointerfaces* 76: 104–111). Se ha observado una correlación significativa entre la unión bacteriana y la rugosidad del material para *S. aureus*, una bacteria que se sabe que es sensible a las irregularidades de la superficie (Harris y  
 20 Richards, 2006. *Injury* 37: 3-14).

La formación de biopelículas en biomateriales se puede dividir generalmente en dos etapas principales: la adhesión bacteriana, que depende de las propiedades superficiales de ambos sustratos y células, y aumento de la masa de biopelículas que  
 25 depende de la unión inicial y la tasa de crecimiento específico de las células unidas. Por esto la posibilidad de encontrar materiales para construir dispositivos que no permitan la adherencia de esta bacteria y la formación de biopelículas es un objetivo de gran interés clínico. Estas superficies que previenen el crecimiento de biopelículas son por consiguiente una forma alternativa para inhibir la propagación de infecciones  
 30 microbianas.

Por otro lado, se conoce muy poco sobre si los monómeros derivados de los PHAs pueden poseer actividad antibacteriana. Así por ejemplo se ha descrito que el ácido *R*-3-hidroxi-*n*-fenilalcanoico tiene actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*  
 35 (Sandoval *et al.*, 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 97-105). También se ha

descrito que otros hidroxiácidos monoméricos derivados de PHAs tienen actividad sobre otras especies bacterianas como por ejemplo *S. aureus* (Ruth *et al.*, 2007. *Biomacromolecules* 8: 279-286). Sin embargo, la potencia antibacteriana de estos compuestos es baja ya que presentan unas MICs (Concentración Mínima Inhibitoria)

5 muy altas, del orden de 1-5 mM.

Ya se ha comentado que los monómeros derivados de los PHAs son 3-hidroxiácidos grasos y en este sentido se sabe que algunos lipopéptidos como la surfactina con actividad antibacteriana contienen unidos hidroxiácidos grasos de 13-15 átomos de

10 carbono (Peypoux *et al.*, 1999. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 553-563), aunque estos compuestos no son derivados de los PHAs. En este mismo sentido también se sabe de la bioactividad de diferentes dosis de ácidos grasos de cadena corta, de cadena media y de cadena larga contra bacterias gram-positivas como *Streptococcus mutans* orales, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguis* (Huang *et al.*, 2010. *Arch.*

15 *Oral Biol.* 55: 555–560) demostrándose que los ácidos grasos de cadena corta C2-C5 tienen una actividad antimicrobiana mínima para esta gama de bacterias (estimado por la concentración inhibitoria al 80%, IC80), mientras que entre los ácidos grasos de cadena media, la IC80 disminuyó al aumentar el tamaño de la cadena. Los ácidos caprílico, mirístico, u oleico, o los ésteres de glicerol como monocaprilina, monolaurina,

20 monomiristina, monopalmitoleína y monooleína causan sólo una inactivación pequeña de *S. aureus*, mientras que el ácido láurico y el ácido palmitoleico tienen un efecto intermedio (Bergsson *et al.*, 2001. *APMIS* 109: 670–678). Sin embargo, la monocaprina y el ácido cáprico reducen los títulos de infectividad de *S. aureus* y muestran las actividades más altas (Bergsson *et al.*, 2001. *APMIS* 109: 670–678). La

25 especificidad en las actividades de los ácidos grasos y monoglicéridos contra varias bacterias es notable. La diferencia entre los perfiles de actividad de lípidos para los estreptococos y *S. aureus*, posiblemente, podría explicarse por diferencias en la reticulación de polímeros de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias. Además, el peptidoglicano de *S. aureus* se entremezcla con moléculas de ácido ribitol-

30 teicoico, el cual es relativamente específico para esta bacteria (Sherris y Plorde, 1990. *Staphylococci*. En: *Medical Microbiology: an Introduction to Infectious Diseases*, páginas 275-289. Edited by J. C. Sherris. New York:Elsevier).

A pesar de todos estos conocimientos no se ha descrito aún ninguna actividad

35 antibacteriana de los PHAs sin que tengan que para ello ser mezclados o modificados

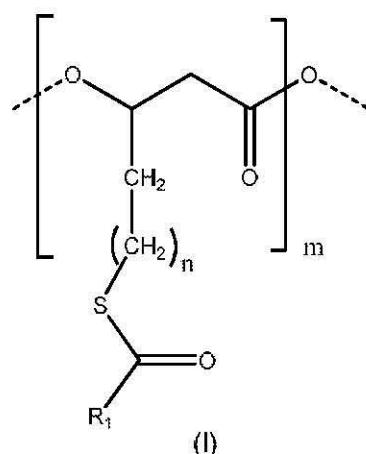
con otros compuestos. Tampoco se ha descrito ninguna actividad antiadherente bacteriana intrínseca a los PHAs. Y aunque si se ha descrito que algunos monómeros derivados de PHAs pueden tener actividad antibacteriana, por el momento los monómeros descritos poseen una actividad muy limitada a muy altas dosis.

5

## DESCRIPCION DE LA INVENCION

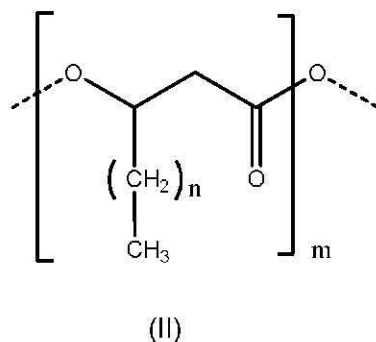
En los ejemplos de la presente invención se demuestra que un tipo concreto de polihidroxialcanoatos (PHA) denominados PHACOS (polihidroxialcanoatos que  
10 presentan grupos tioéster en la cadena lateral ó polihidroxiaciltioalcanoatos, tal y como se han definido en la solicitud de patente ES2399765) son útiles como agentes antibacterianos o bactericidas. De esta forma, en la presente invención se demuestra que estos polihidroxiaciltioalcanoatos, tienen un efecto bactericida que no se muestra con otros polihidroxialcanoatos similares que no presentan grupos tioéster. Este efecto  
15 es especialmente notable frente a organismos del género *Staphylococcus* y más concretamente frente a *Staphylococcus aureus*. Este efecto se produce no sólo mediante la utilización del polímero completo, sino mediante la utilización de elementos derivados del mismo como pueden ser hidrolizados del polímero, o incluso los monómeros que se producen en su hidrólisis. Estos elementos se pueden utilizar  
20 de forma independiente o incluidos en una composición que comprenda algunos de estos elementos únicamente o en combinación con otros elementos bactericidas que puedan potenciar este efecto.

Por todo ello un primer aspecto de la invención se refiere a una composición de ahora  
25 en adelante “composición de la invención”, que comprende un polihidroxiaciltioalcanoato o PHACOS, un hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado o cualquiera de sus combinaciones. En la presente invención, se entiende un PHACOS como un polímero de origen natural que comprende monómeros de fórmula (I):



donde m representa el número de veces que se repite el monómero de fórmula (I) a lo largo del PHACOS; n tiene un valor de 1 a 15 y preferiblemente de 1 a 5; R<sub>1</sub> es un alquilo de 1 a 10 carbonos y preferiblemente de 1 a 5. La línea discontinua representa los enlaces que se establecen entre los distintos monómeros que forman el PHACOS.

El PHACOS de la invención también puede comprender monómeros de fórmula (II):



donde m y n se definen como anteriormente.

10

En la presente invención se entiende como “alquilo” radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 5, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno (denominándose haloalquilo), hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

20 Dado el efecto bactericida de los elementos de la composición esta composición adicionalmente puede comprender otros elementos que complementen la actividad del

polihidroxiaciltioalcanoato, del hidrolizado del mismo o del producto aislado del hidrolizado como por ejemplo un compuesto bactericida o bacteriostático como por ejemplo, aunque sin limitarse, quitosano, oligolisina, polinorbonreno o polietilenimina. Por todo ello, en una realización preferida la composición además comprende otro

5 compuesto bactericida o bacteriostático. En una realización más preferida el compuesto bactericida o bacteriostático se selecciona de la lista que comprende quitosano, oligolisina, polinorborneno o polietilenimina.

Se entiende por “producto aislado del hidrolizado” en la presente invención aquel

10 elemento que se puede obtener en forma pura una vez se ha hidrolizado el polihidroxiaciltioalcanoato.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, de un hidrolizado del mismo, de un producto aislado del hidrolizado, o de la composición de

15 la invención como bactericida preferiblemente “*ex-vivo*”. Una realización preferida, se refiere al uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, de un hidrolizado del mismo, de un producto aislado del hidrolizado, o de la composición de la invención como bactericida frente a bacterias de los géneros *Staphylococcus* o *Bacillus*, preferiblemente *Staphylococcus* y más preferiblemente “*ex-vivo*”. Una realización más preferida se

20 refiere al uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, de un hidrolizado del mismo, de un producto aislado del hidrolizado, o de la composición de la invención como bactericida frente a bacterias de las especies *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*, preferiblemente *S. aureus* y más preferiblemente “*ex-vivo*”.

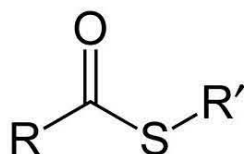
25 En la presente invención se entiende por “bactericida” aquel elemento que provoca la muerte de las bacterias. Este uso como agente bactericida del polihidroxiaciltioalcanoato que presenta grupos tioéster en la cadena lateral o polihidroxiaciltioalcanoato o PHACOS, del hidrolizado del mismo, o del producto aislado del hidrolizado se refiere a un uso “*ex-vivo*”. Así, se pueden utilizar por ejemplo, aunque sin limitarnos, en la

30 industria textil; en la industria alimentaria, como por ejemplo, para el recubrimiento de alimentos o envases con el fin de evitar su contaminación por bacterias y, por tanto, de evitar una potencial intoxicación en el cuerpo humano o animal una vez que el alimento es ingerido; en agricultura, como por ejemplo, en tratamientos fitosanitarios, o para el recubrimiento de material que vaya a ser empleado por ejemplo en cirugía.

35

La expresión “*ex-vivo*” se refiere a que el elemento que se trate con el polihidroxiaciltioalcanoato, el hidrolizado del mismo, o el producto aislado del hidrolizado se encuentra fuera del cuerpo humano o animal.

- 5 Se entiende por “tioéster” en la presente invención a un compuesto con un grupo funcional tioéster, que se representa de la siguiente manera:



10

Donde: R y R' son independientemente dos grupos orgánicos iguales o diferentes. Un tioéster se forma por la esterificación entre un ácido carboxílico y un tiol.

- Dado el efecto bactericida, el polihidroxiaciltioalcanoato, el hidrolizado o los productos  
 15 aislados del hidrolizado o las composiciones que los comprendan podrían ser utilizados para producir medicamentos frente a infecciones bacterianas, preferiblemente producidas por bacterias de los géneros *Staphylococcus* o *Bacillus* y mas preferiblemente del género *Staphylococcus*. Concretamente, el polihidroxiaciltioalcanoato, el hidrolizado o los productos aislados del hidrolizado tienen  
 20 un gran efecto sobre bacterias de las especies *S. epidermidis* y *S. aureus*, siendo especialmente efectivo y de especial importancia el efecto sobre *S. aureus* por ser uno de los factores desencadenantes de enfermedades nosocomiales más importantes. Por ello, podrían ser utilizados para producir medicamentos frente a infecciones bacterianas, preferiblemente producidas por bacterias de las especies *S. epidermidis* y  
 25 *S. aureus* y más preferiblemente de la especie *S. aureus*. Por tanto otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, de un hidrolizado del mismo, de un producto aislado del hidrolizado o a la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternatively, al polihidroxiaciltioalcanoato, a un hidrolizado del mismo, a un producto aislado del hidrolizado o a la composición de  
 30 la invención para su uso como medicamento. En una realización preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas. Más preferiblemente, la infección bacteriana es producida por bacterias tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, bacterias de los géneros *Staphylococcus* o *Bacillus*. Aún más preferiblemente las bacterias pertenecen a las especies *S. aureus* o *S. epidermidis*. Aun más preferiblemente, la infección bacteriana se produce en humanos.  
 35

El término “medicamento” en la presente invención se refiere a un medicamento de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el  
5 tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como  
10 poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

15 Se entiende por “infección bacteriana” la colonización de un organismo huésped, preferiblemente de un mamífero no humano o de un humano, más preferiblemente de un humano, por parte de una bacteria patógena. Preferiblemente, la infección bacteriana es producida por bacterias tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, bacterias del género *Staphylococcus* o *Bacillus*, y más preferiblemente bacterias de la  
20 especie *S. aureus* o *S. epidermidis*.

El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente  
25 un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- 30 (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente  
35 un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición

patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

Debido al efecto bactericida que presenta, y a sus características como polímero, estos polihidroxiaciltioalcanoato pueden ser utilizados para fabricar materiales bactericidas que puedan tener diferentes aplicaciones. Dentro de estos materiales, por ejemplo, los polihidroxiaciltioalcanoato pueden ser utilizados para fabricar o recubrir elementos que puedan utilizarse en cirugía, para la fabricación o recubrimiento de embases alimentarios, como soporte en el que se puedan crecer células diferentes de las bacterias sobre las que tiene efecto bactericida, etc. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, de un hidrolizado del mismo, de un producto aislado del hidrolizado, o de la composición de la invención para la fabricación o recubrimiento de un material bactericida preferiblemente frente a bacterias de los géneros *Staphylococcus* o *Bacillus* y más preferiblemente las bacterias pertenecen a las especies *S. aureus* o *S. epidermidis*. En una realización preferida de este aspecto de la invención el material se selecciona de entre implante quirúrgico, envase alimentario o soporte para el crecimiento de células.

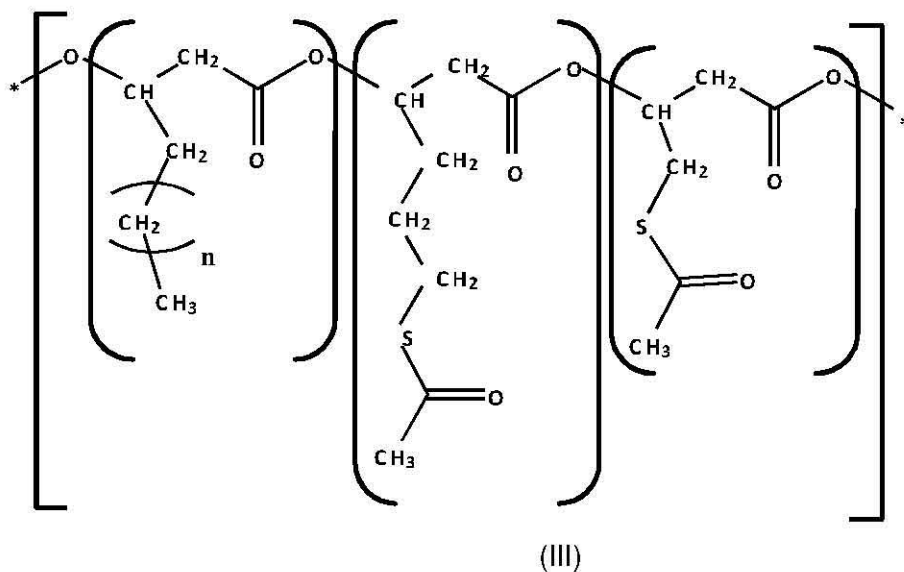
Se entiende por “material bactericida” aquel material que no permite el crecimiento de bacterias en su superficie o dentro de él debido a la capacidad que presenta de matar bacterias.

Los polihidroxiaciltioalcanoatos, pueden ser obtenidos por métodos conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante el método descrito en los ejemplos de la presente invención. Brevemente este método consiste en la incubación de una célula capaz de producir PHACOS en un sustrato donde el sustrato comprende al menos un compuesto alifático funcionalizado con un grupo tioéster. La célula puede ser cualquier tipo de célula capaz de formar PHACOS.

De forma más concreta la síntesis se puede realizar por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante la incubación de la cepa *Pseudomonas putida* KT2442 en medio M63. Se utilizan como fuentes de carbono el ácido decanoico 2,4 mM como co-sustrato y ácido 6-acetilthiohexanoico (6-ATH) 12 mM. Después de 24 horas de incubación los cultivos en medio M63 fueron recogidos. Se rompen las células y se precipitan. El precipitado se disuelve en un disolvente orgánico y agua, y tras agitar se descarta la parte acuosa.

Los polihidroxiaciltioalcanoatos pueden ser de varios tipos, como por ejemplo, pero sin limitarse pueden estar formados por 3-hidroxiaciltioalcanoatos y 3-hidroxi-alcanoatos, o únicamente estar formados por 3-hidroxiaciltioalcanoatos.

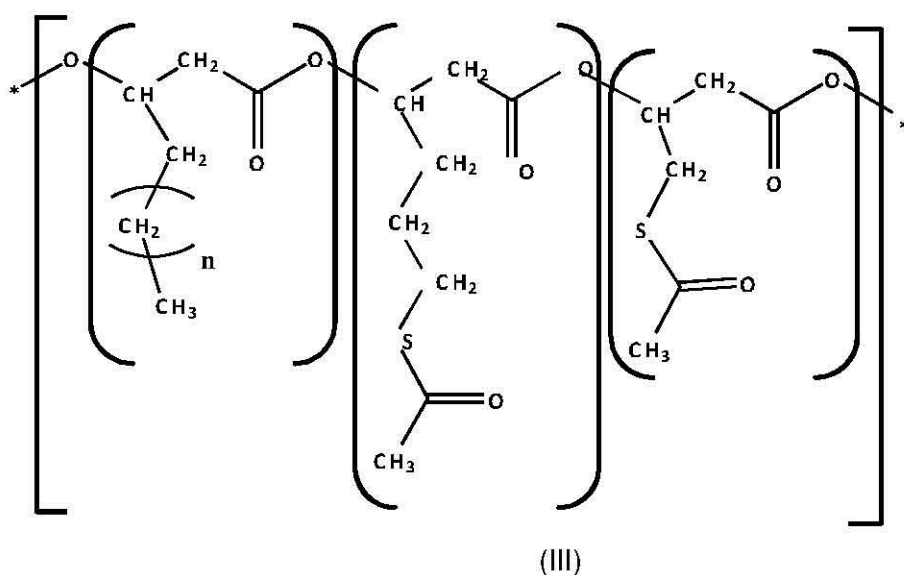
- 5 Un ejemplo de polihidroxiaciltioalcanoato es por ejemplo, aunque sin limitarse, aquel que presenta varias repeticiones de cada uno de los monómeros que se incluyen en la fórmula (III):



- 10 en la que n puede tener cualquier valor seleccionado de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Este polihidroxiaciltioalcanoato incluye un 3-hidroxi-alcanoato, el cual puede tener una cadena de carbonos de tamaño variable, y dos 3-hidroxiaciltioalcanoatos.
- 15 Por todo lo descrito, de forma preferida el polihidroxiaciltioalcanoato comprende 3-hidroxi-alcanoatos y 3-hidroxiaciltioalcanoatos, o únicamente 3-hidroxiaciltioalcanoatos.

- El polihidroxiaciltioalcanoato puede estar formado por un único tipo de monómeros o por diferentes tipos de subunidades. De de forma preferida el
- 20 polihidroxiaciltioalcanoato está formado por un único tipo de monómero.

En otra realización preferida el polihidroxiaciltioalcanoato presenta la fórmula (III):



donde n puede ser cualquier valor seleccionado de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

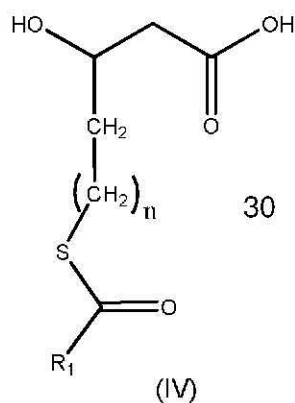
5

Dentro de los posibles monómeros que pueden formar parte del polihidroxiaciltioalcanoato se encuentran por ejemplo, aunque sin limitarse, los (*R*)-3-hidroxiaciltioalcanoatos, los cuales tal y como se muestra en los ejemplos pueden formar parte de los PHACOS. Dentro de estos (*R*)-3-hidroxiaciltioalcanoatos, se encuentran como monómeros de mayor utilidad el ácido 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, ácido 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico, y los derivados hidroxilados de los ácidos 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiobutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiohexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico, 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico. Por todo ello en otra realización preferida el polihidroxiaciltioalcanoato comprende como monómeros ácidos (*R*)-3-hidroxiaciltioalcanoicos. En una realización más preferida los ácidos (*R*)-3-hidroxiaciltioalcanoicos se seleccionan de la lista que comprende: ácido 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, ácido 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico, y los derivados hidroxilados de los ácidos 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiobutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiohexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico,

8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico, 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.

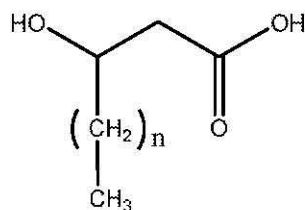
Por otro lado el polihidroxiaciltioalcanoato de la invención puede ser hidrolizado de forma que se separen parte de sus componentes. Estos componentes, dado que presentan los grupos tioéster en las cadenas laterales seguirán teniendo el mismo efecto bactericida que el polihidroxiaciltioalcanoato de la presente invención. Estos elementos se pueden utilizar como bactericidas tanto en conjunto en forma del hidrolizado completo o bien separando algunos de los mismos y utilizarlos de forma independiente. El hidrolizado se puede obtener mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo mediante hidrólisis química o hidrólisis enzimática. Dentro de la hidrólisis enzimática se puede utilizar por ejemplo aunque sin limitarse una enzima despolimerasa como por ejemplo la enzima PhaZ que hidroliza PHA. De esta forma se pueden obtener los elementos incluidos dentro del polímero como los (*R*)-3-hidroxiaciltioalcanoatos, como por ejemplo aunque sin limitarse el ácido 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, ácido 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico, y los derivados hidroxilados de los ácidos 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiobutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiohexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico, ó 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.

Por todo esto, en una realización preferida el hidrolizado de la invención contiene ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos de fórmula (IV):



donde n tiene un valor de 1 a 15 y preferiblemente de 1 a 5; R<sub>1</sub> es un alquilo de 1 a 10 carbonos y preferiblemente de 1 a

5;

y opcionalmente 3-hidroxi- $\alpha$ -alcanoatos de fórmula (V):

(V)

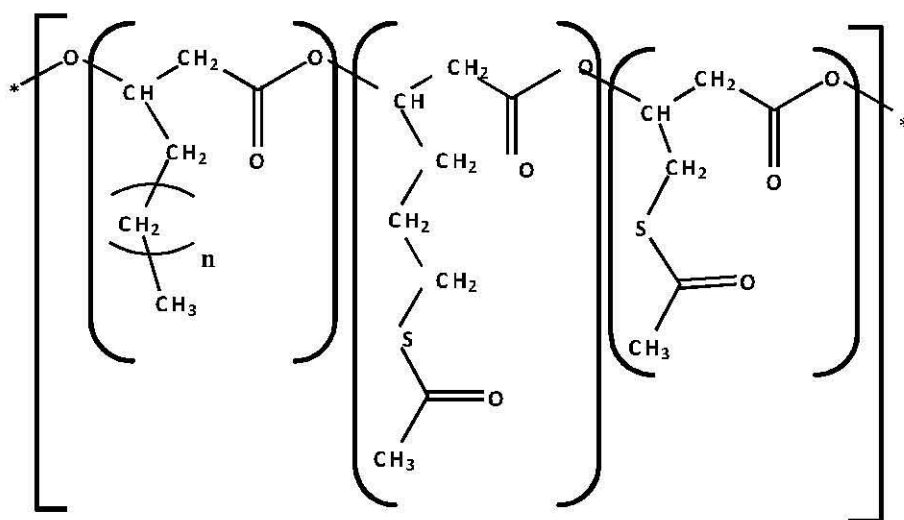
donde n se define como anteriormente.

5

En una realización más preferida los ácidos (*R*)-3-hidroxi- $\alpha$ -alcanoicos se seleccionan de la lista que comprende ácido 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, ácido 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico, y los derivados hidroxiados de los ácidos 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiobutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiohexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoiltiooctanoico, 5-butanioiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico, ó 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.

15

En otra realización preferida el hidrolizado de la invención comprende el producto de fórmula (III):



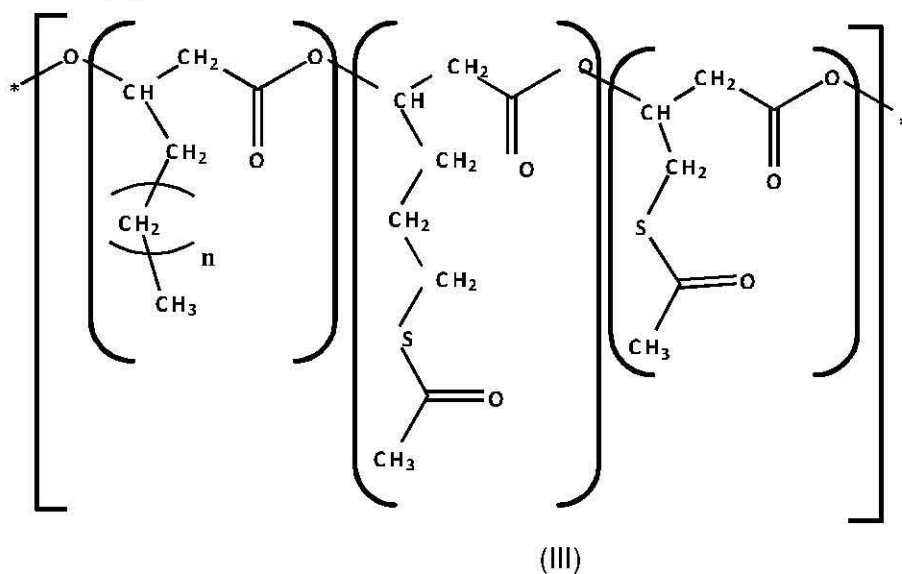
(III)

donde n puede ser cualquier valor seleccionado de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

y 12.

En otra realización preferida el producto aislado del hidrolizado es un ácido (R)-3-hidroxi-aciltioalcanoico. En una realización aun más preferida el producto aislado del hidrolizado es un ácido (R)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos seleccionados de la lista que comprende ácido 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, ácido 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico, y los derivados hidroxilados de los ácidos 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiobutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiohexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico ó 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.

En otra realización preferida el producto aislado del hidrolizado es el producto de fórmula (III):



donde n puede ser cualquier valor seleccionado de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

20

Dada la capacidad antibacteriana de los polihidroxiaciltioalcanoatos, sus hidrolizados, los elementos aislados del hidrolizado o las composiciones de la invención, estos elementos pueden ser utilizados para fabricar materiales bactericidas. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de un material bactericida que comprende recubrir un material con un polihidroxiaciltioalcanoato

25

que presenta grupos tioéster en la cadena lateral, un hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado, o la composición de la invención formando al menos una capa externa antibacteriana.

- 5 El procedimiento de forma preferible puede además comprender los siguientes pasos:
  - a. el polihidroxiaciltioalcanoato que presenta grupos tioéster en la cadena lateral, el hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado, o la composición de la invención se pone en contacto con un solvente orgánico, y
  - 10 b. el producto obtenido en (a) se aplica sobre el material.

El procedimiento para la fabricación de un material bactericida además de lo descrito previamente puede comprender la eliminación de las toxinas del polihidroxiaciltioalcanoato, del hidrolizado del mismo, de un producto aislado del hidrolizado, o de la composición de la invención y/o la esterilización del material bactericida recubierto.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1. Representa la actividad antibacteriana de los discos contruidos con PHACOS y PHO determinada según la norma ISO 22196:2007 (E).**

30 **Figura 2. Representa la capacidad de los discos contruidos con PHACOS y PHO para inhibir la formación de biopelículas bacterianas determinada mediante dos procedimientos:** A) la tinción de la biopelícula con el colorante cristal violeta se considera un valor de 100% a la capacidad de formar biopelículas sobre discos de PET; y B) el contaje de las unidades formadoras de colonia (UFC).

35

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que demuestran la eficacia de los polihidroxiaciltoalcanoato de la invención como bactericidas. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante muestran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

**EJEMPLO 1. Producción de los PHACOS por fermentación.**

La cepa de *Pseudomonas putida* KT2442 ha sido la cepa utilizada en este estudio. La cepa *P. putida* se cultiva en medio mínimo M63 0,1 N (13,6 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , ajustado a pH 7,0 con KOH), un medio mínimo limitado en su contenido en nitrógeno, a una temperatura de 30° C y agitación a 250 rpm tal y como se ha descrito previamente (Moldes *et al.*, 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3205-3012). Este medio fue suplementado con  $\text{MgSO}_4$  1 mM y una solución de elementos traza (composición  $\times 1.000$ : 2,78 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,98 g/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2,81 g/l  $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,47 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,17 g/l  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,29 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Como fuentes de carbono se utilizaron ácido decanoico 2,4 mM como co-sustrato y ácido 6-acetilthiohexanoico (6-ATH) 12 mM. El crecimiento fue monitorizado con un espectrofotómetro Shimadzu UV-260 a 600 nm. Cuando se necesitaron medios sólidos de cultivo estos medios se suplementaron con un 1,5% (p/v) de agar.

Después de 24 horas de incubación los cultivos en medio M63 0,1 N fueron recogidos por centrifugación y resuspendidos en solución salina. Para romper las células se pasaron por la prensa de French dos veces. La solución se centrifugó a  $15.000 \times g$  durante 30 minutos y el precipitado se disolvió en 10 ml de cloroformo. Para extraer los compuestos solubles en agua, se añadieron 2 ml de agua y se mezclaron las fases acuosa y orgánica por agitación, tras lo cual se separaron mediante centrifugación a  $5.000 \times g$ . La fase orgánica (inferior) se transfirió a otro tubo y el procedimiento se repitió añadiendo 10 ml de cloroformo a la fase acuosa. La fase orgánica se precipitó en 10 volúmenes de metanol frío agitado con varilla magnética. Tras decantar la

mezcla metanol/cloroformo, el polímero resultante se secó durante la noche y se almacenó a temperatura ambiente.

La biomasa de la cepa *P. putida* fue de 0,6 mg/ml y la producción de PHACOs 0,1 mg/ml.

El contenido celular y la composición del PHA se han determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en sedimentos secos (deshidratados), obtenidos a partir de las células de *P. putida*.

El polímero contiene ácidos 3-hidroxi-alcanoicos derivados del ácido decanoico (e.g., octanoico, decanoico y trazas de hexanoico), así como monómeros derivados del 6-ATH (3-hidroxi-6-acetiltiohexanoato), ambos utilizados como precursores en el crecimiento de las bacterias.

15

## **EJEMPLO 2. Obtención de los materiales contruidos con PHACOS.**

Los PHACOs aplicados en este estudio fueron los obtenidos en el ejemplo 1. El contenido de monómero de poli-acetiltiohidroxialcanoato (PHACOS) fue 29,7% de monómeros no-functionalizados OH-Alk (3-hidroxi octanoato (OH-C8), 3-hidroxi decanoato (OH-C10), y trazas de 3-hidroxi hexanoato (OH-C6)) y 70,3% de monómeros functionalizados (46,4% de 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoato (OH-6ATH) y 23,9% de 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoato (OH-4ATB)) analizado por RMN.

El poli-3-hidroxi octanoato-co-hidroxi hexanoato (PHO) utilizado en este estudio fue obtenido de 8,5% de OH-C6 y 91,5% de OH-C8 según el análisis de GC-MS.

La eliminación de endotoxinas de los PHAs se realizó como se ha descrito previamente (Furrera *et al.*, 2007. *J. Microbiol. Meth.* 69: 206–213). Brevemente, 1 g de PHA se disolvió en 100 ml de cloroformo a 40 °C con una intensa agitación y posteriormente, la suspensión se filtró a presión (Vacuubrand MZ2C bomba de vacío de diafragma). Para separar el PHA de las impurezas co-extraídas, el polímero se mezcló con metanol que indujo la precipitación del polímero, dejando la mayor parte de los contaminantes en solución. La precipitación de PHA en solución se realizó a 4 °C con agitación intensa durante 4 h. Finalmente, el polímero se secó bajo vacío a 40

°C durante 48 h. El procedimiento se repitió dos veces para obtener un polímero que contiene menos de 20 EU/g de endotoxigenidad. La endotoxigenidad se midió utilizando un lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL)-test (test Kit Pyrogent Plus individual, 0,125 EU / ml, Lonza) de acuerdo con el protocolo descrito (Furrera *et al.*, 2007. *J. Microbiol. Meth.* 69: 206-213). Cada análisis se llevó a cabo al menos dos veces. Usando este método, la endotoxigenidad de los productos purificados de PHACOS y de PHO fueron menos de 12 EU/g y 15 EU/g, respectivamente.

Para la fabricación de implantes, se utilizaron discos de PET (polietileno tereftalato) que se revistieron con los PHAs por el método del disolvente de colada; es decir los materiales poliméricos PHACOS y PHO disueltos en cloroformo (2% p/v) se aplicaron sobre discos de PET estériles libres de endotoxinas (6 mm de diámetro) y los discos se secaron durante 72 h a temperatura ambiente. Los discos resultantes se esterilizan durante la noche con óxido de etileno a 40 °C.

### **EJEMPLO 3. Preparación de las bacterias utilizadas en los ensayos.**

Las bacterias que se prepararon para las distintas pruebas han sido:

a) *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, Rosenbach 1884 CECT 86

b) *Escherichia coli* CECT 516

c) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 CECT 4122

d) *Staphylococcus epidermidis* CECT 232

e) *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051

f) *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* CECT 926

g) *Streptococcus pyogenes* CECT 59

h) *Staphylococcus aureus* 61115 MRSA 201232560

i) *Staphylococcus aureus* 61286 MRSA 201237858

j) *Staphylococcus aureus* 61314 MRSA 201238814/12

Para el medio de cultivo líquido se utilizó Nutrient Broth 1/500 (1/500 NB) constituido por Nutrient Broth Difco™ (ref 234000, Becton, Dickinson and Company, Francia) que se preparó para su uso de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se esterilizó mediante autoclave.

- Para el medio de cultivo sólido se utilizó Agar nutritivo que se preparó con 5,0 g de Nutrient Broth Difco™ (ref 234000, Becton, Dickinson and Company, Francia) 15,0 g de polvo de agar que se disolvieron en 1 000 ml de agua destilada. Después se esteriliza por autoclave y se utilizó para preparar cultivos en tubos con medio inclinado
- 5 “*slants*”. Para ello, 10 ml de agar nutritivo estériles se vertieron en un tubo de ensayo con tapón de rosca estériles. Los tubos de ensayo se colocaron en un ángulo de inclinación de aproximadamente 15° con respecto a la línea horizontal y se permitió que el agar se solidificase.
- 10 Para preparar las placas de agar LB para el recuento de bacterias, se disolvieron 2,5 g de extracto de levadura, 5,0 g de triptona y 1,0 g de glucosa en 1 000 ml de agua destilada. El pH fue ajustado a un valor entre 7,0 y 7,2 (a 25 °C) con hidróxido sódico o ácido clorhídrico. Luego se añadieron 15,0 g de polvo de agar y se esterilizó en autoclave antes de verterlo en placas de Petri estériles.
- 15
- Para el pre-cultivo de todas las bacterias para los ensayos de actividad antibacteriana, adherencia y formación de biopelículas, las bacterias se transfirieron desde un stock congelado a -80 °C con 15% de glicerol, mediante el uso de un asa de inoculación estéril, a un cultivo madre en tubos con medio inclinado “*slants*” y se incubaron  $36 \pm 1$
- 20 °C durante 16-24 h. Posteriormente y mediante un asa de inoculación estéril se transfirieron las bacterias desde este cultivo a otro medio fresco de medio de cultivo inclinado y se incubaron a  $36 \pm 1$  °C durante 16-20 h.
- Para ensayar la actividad antibacteriana de los materiales y la capacidad adherente a
- 25 las superficies ensayadas, las bacterias precultivadas en los cultivos inclinados se suspendieron en 2 ml de medio líquido 1/500 NB para que sirviesen como una suspensión celular según el protocolo descrito en la norma ISO 22196:2007(E). La concentración de bacterias se estimó mediante el cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) en la suspensión mediante la realización de diluciones seriadas 1/10
- 30 en PBS que fueron depositadas en placas de LB para el conteo. Después de la incubación, se contó el número de UFC en las placas de Petri.
- En los ensayos correspondientes a la capacidad bacteriana para formar biopelículas sobre las superficies analizadas, las bacterias precultivadas en los cultivos inclinados
- 35 se transfirieron con un asa de siembra y fueron crecidas con aireación en Trypticase

Soy Broth (TSB) suplementado con 0,3% de glucosa y 0,4% de extracto levadura durante 20 h a 37 °C. La concentración bacteriana se estimó espectrofotométricamente a 600nm.

**5 EJEMPLO 4. Ensayos de la actividad antibacteriana de los materiales contruidos con PHACOS.**

La actividad antibacteriana de los PHACOS se determinó según la norma ISO 22196:2007 (E) (Medida de la actividad antibacteriana en superficies de plástico) con  
10 ciertas modificaciones.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se enumeran en el ejemplo 3.

Se ensayaron los materiales o discos contruidos por PHACOS, PHO y PET.  
15

Cada disco a ensayar se depositó en una placa de Petri por separado sobre un papel de filtro humedecido con agua para mantener una humedad relativa no menor al 90%. Sobre la superficie del material o disco que se quiere ensayar se inocularon entre  $6,2 \times 10^3$  y  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e incubaron en condiciones estáticas durante 24 h a  
20 37°C. No se utilizó la película o material de cubierta que se indica en la norma ISO 22196:2007(E) encima de cada suspensión celular. Cada material se ensayó por triplicado.

Se utilizaron dos controles; 1) discos de PET sin recubrir con PHO ó PHACOS, para  
25 comprobar la viabilidad de las bacterias en el soporte. 2) Discos de PET recubiertos de PHO, para ver el efecto del PHA no funcionalizado sobre la viabilidad celular.

Los controles y los discos recubiertos de PHACOS fueron analizados según la normativa ISO 22196:2007(E) a las 0 h y a las 24 h. En todos los casos y tras la  
30 incubación de los discos con la suspensión bacteriana a ensayar, se procedió al lavado de la superficie de los discos con 1 ml de tampón fosfato salino fisiológico (10 mM PBS, pH 7,2). El número de colonias recuperado de los discos de PET control a las 0 horas es el valor que fue posteriormente utilizado para determinar la tasa de recuperación de las bacterias de las muestras de ensayo en investigación.

35

Las bacterias viables se determinaron mediante la realización de diluciones seriadas 1/10 en PBS de las bacterias lavadas con 1 ml de PBS de los discos. 1 ml de cada dilución se mezclaron con 15 ml de agar LB a 38 °C, se vertieron en cada placa de Petri y se agitaron suavemente para dispersar las bacterias. Todas las siembras en  
5 placa de bacterias se realizaron por duplicado. Las placas de Petri se incubaron a  $36 \pm 1$  °C durante 40-48 h.

Después de la incubación, se contó el número de colonias en las placas de Petri. Las placas que contenían 30 a 300 colonias fueron seleccionadas como adecuadas para  
10 valorar el ensayo.

La actividad antibacteriana se calculó según la ecuación que se indica en la norma ISO 22196:2007 (E).

15 Para cada muestra de ensayo, el número de bacterias viables recuperadas se determinó de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A$$

donde

N es el número de bacterias viables recuperadas por cm<sup>2</sup> por muestra de ensayo;

20 C es el recuento de placa promedio de los duplicados de placas;

D es el factor de dilución para las placas contadas;

V es el volumen, en mililitros, de PBS añadido a la muestra;

A es el área de la superficie, en mm<sup>2</sup>, de la película de cubierta.

25 La actividad antibacteriana se calculó mediante la siguiente ecuación, registrando el resultado con un decimal.

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

donde

R es la actividad antibacteriana;

30 U<sub>0</sub> es la media del logaritmo común de N, que se recuperó de las muestras de ensayo no tratados inmediatamente después de la inoculación;

U<sub>t</sub> es la media del logaritmo común de N, que se recuperó de las muestras de prueba sin tratar después de 24 h;

35 A<sub>t</sub> es la media del logaritmo común de N, que se recuperó de las muestras de prueba tratadas después de 24 h.

La figura 1 muestra el resultado obtenido donde se indica que los discos recubiertos con PHACOS inhiben el crecimiento de las cepas de *S. aureus* de forma que sólo sobreviven un 10% de las células cuando se comparan con el control.

5

**EJEMPLO 5. Ensayos de la actividad antibacteriana de los materiales contruidos con PHACOS para evitar la formación de biopelículas.**

Mediante este ensayo se estudió la capacidad de los discos contruidos con PHACOS para evitar la formación de biopelículas bacterianas en su superficie en comparación con otros materiales. A tal fin se utilizó como modelo las bacterias *S. aureus* CECT 86 y *P. aeruginosa* CECT 4122 que son capaces de formar biopelículas en la superficie de distintos materiales (Mauclaire *et al.*, 2010. *Biointerfaces* 76: 104-111).

La capacidad de las bacterias para formar biopelículas en las superficies de los discos contruidos con materiales biopoliméricos, se examinó mediante dos procedimientos: i) la tinción de la biopelícula con el colorante cristal violeta; y ii) el contaje de las unidades formadoras de colonia (UFC) bacterianas adheridas a los discos.

Las condiciones optimas para la formación de biopelículas se realizó según el procedimiento descrito para *Streptococcus pneumoniae* (Moscoso *et al.*, 2006. *J. Bacteriol.* 188: 7785-7795). Brevemente, los discos de PET, o los discos de PET recubiertos con PHO o PHACOS (Diámetro = 6 mm) se colocaron en pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos/placa de poliestireno (353947 Falcon, Becton Dickinson), y cada pocillo se inoculó con 1 ml de una suspensión diluida 1:100 (en TSB) de bacteria previamente crecida en TBS suplementado con glucosa y extracto de levadura. La formación de biopelículas en los discos (PHACOS, PHO ó PET) se analizó por triplicado. Las placas fueron incubadas en condiciones estáticas durante 16 h a 37°C, y el crecimiento de las bacterias fue monitorizado a A595 utilizando un lector de placas (microplate absorbance reader 2020; Anthos Labtec Instruments GmbH).

Para cuantificar la formación de biopelículas en los discos por el método de tinción se utilizó el protocolo descrito previamente (Moscoso *et al.*, 2006. *J. Bacteriol.* 188: 7785-7795). Brevemente, después de la tinción con 0,5% cristal violeta y lavado por

inmersión para eliminar las bacterias no adheridas, la biopelículas formadas se separaron mecánicamente de los discos, solubilizaron en 95% etanol (200 µl por pocillo) y la absorbancia se determinó a 595 nm utilizando lector de placas (Anthos 2020 microplate absorbance reader, Anthos Labtec Instruments).

5

Para contar las UFC de las bacterias presentes en la biopelícula, después de la incubación más arriba mencionada y tres lavados de los discos con PBS, la biopelícula, en este caso sin teñir, presente en el disco se resuspendió mecánicamente desde el disco en una solución de 10 mM PBS, pH 7,2 con una punta  
10 estéril de micropipeta automática. A partir de esta solución conteniendo las bacterias liberadas de la biopelícula se hicieron diez diluciones seriadas y se sembraron en placas de LB. Las bacterias se contaron después de 24 h de incubación a 37 °C.

La figura 2 demuestra que la presencia de PHACOS en la superficie del disco provoca  
15 una disminución de dos veces en la formación de biopelículas de *S. aureus* y no de *P. aeruginosa* comparado con el control de discos de PET sin recubrir.

#### **EJEMPLO 6. Ensayos de mortalidad de las bacterias adheridas a los materiales construidos con PHACOS.**

20

Mediante este ensayo se estudió la capacidad de los discos construidos con PHACOS para matar las bacterias adheridas a su superficie en comparación con otros materiales. A tal fin se utilizaron como modelos las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa* que son capaces de adherirse a la superficie de distintos materiales.

25

El número y la viabilidad de las bacterias adheridas a la superficie de los biopolímeros se determinaron por microscopía de fluorescencia utilizando la prueba de viabilidad bacteriana el BacLight™ LIVE / DEAD (Invitrogen L13152). Se siguió el mismo protocolo como se ha indicado para la medición de la actividad antibacteriana en  
30 superficies de plástico de acuerdo con la norma ISO 22196:2007 (E). Como inóculo de prueba se utilizó la suspensión bacteriana en 1/500 NB a una concentración bacteriana entre  $1 \times 10^8$  células/ml y  $2 \times 10^8$  células/ml. Después de la incubación se lavaron las bacterias de la superficie del disco y se realizó una tinción siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes (BacLight™ LIVE / DEAD, Invitrogen  
35 L13152). Las muestras se visualizaron mediante un microscopio Zeiss Axioplan

Universal de epifluorescencia operado por fluorescencia de luz incidente y las técnicas de contraste de campo claro y contraste de fase. Las micrografías se registraron con un DFC350FX digital de cámara Leica.

- 5 Hay que señalar que a diferencia de los ensayos de formación de biopelículas en estas condiciones de ensayo las bacterias no se reproducen durante el tiempo de incubación, ya que el medio de cultivo contiene una mínima cantidad de nutrientes que solo permite mantener las bacterias vivas pero no permite su división.
- Los resultados demostraron que el 80% de las células de *S. aureus* no fueron viables, es decir, están muertas tras entrar en contacto con un disco recubierto de PHACOS, 10 en tanto que tan solo un 17 % de las células no son viables en el disco recubierto con PHO.

- Hay que señalar que el número total de bacterias tras la incubación presentes en la 15 superficie de estos discos recubiertos de PHACOS comparadas con las bacterias presentes en los discos controles recubiertos con PHO es similar, lo que demuestra que la adhesión bacteriana no está disminuida, pero sí que se afecta la supervivencia de las bacterias.

## 20 **EJEMPLO 7. Ensayos de la actividad antibacteriana de los hidrolizados de PHACOS**

- Para determinar la actividad antibacteriana de los hidrolizados de PHACOS, dos 25 mezclas de reacción que contenían 3,4 mg/ml de látex de PHACOS en 0,2 M Tris-HCl (pH 8), y el control 3,0 mg/ml de látex de PHO en 0,2 M Tris-HCl (pH 8) fueron sometidos por separado a hidrólisis enzimática con la mcl-PHA despolimerasa extracelular PhaZGK13, de *Pseudomonas fluorescens* GK13 (0,2 mg por ensayo). Tras 1h de incubación a 37°C, los sobrenadantes de cada mezcla de reacción se centrifugaron y filtraron (filtro de 0,2 micras), y los productos de degradación se 30 identificaron y cuantificaron mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS). Se determinó que el hidrolizado de PHACOS estaba compuesto por 63% de trímero (tres monómeros unidos de 3-hidroxi-acetiltiohexanoato) y 30% de trímeros que contienen una mezcla de monómeros de 3hidroxi-octanoico y 3hidroxi-acetiltiohexanoico. El resto (7%) es una mezcla de todos los monómeros y dímeros. El 35 hidrolizado de PHO contenía 66% de dímero (dos monómeros unidos de 3-

hidroxioctanoico) y 26% de trímero (tres monómeros unidos de 3-hidroxioctanoico) y un resto mezcla de todos los monómeros y dímeros de 3-hidroxioctanoico y 3-hidroxihexanoico.

- 5 Por otra parte se prepararon soluciones stocks de los ácidos orgánicos ácido 6-acetiltiohexanoico (545554, Sigma-Aldrich), octanoico (C5038, Sigma-Aldrich) y hexanoico (P9767, Sigma-Aldrich), para ensayarlos de forma comparativa al hidrolizado PHACOS y PHO en el análisis de la actividad antimicrobiana.
- 10 Tanto los ácidos orgánicos 6-acetiltiohexanoico, octanoico y el ácido hexanoico como los hidrolizados de PHACOS y PHO, fueron utilizados para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) mediante el ensayo estándar de microdilución de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) frente la cepa *S. aureus* (CECT 86).

15

Las soluciones stock de cada compuesto se prepararon en 10mM PBS, pH 7,2 con una concentración inicial de 60 mM. A continuación, se prepararon las diluciones seriadas en Muller-Hinton broth (MHB, Becton Dickinson) para la determinación de los valores MIC. Las diluciones se repartieron (100 µL por pocillo) en placas estériles

- 20 multipocillo de poliestireno (96-well round bottom clear plates, Cultek S.L.U., Spain). El inóculo de *S. aureus* (CECT 86) en MHB se añadió a cada pocillo, con una concentración final de  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Un control positivo (que contenía el inóculo sin compuesto) y un control negativo (que contenía el compuesto sin inóculo) se incluyeron en cada placa multipocillo. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se
- 25 definió como la concentración más baja de la sustancia ensayada que inhibe el crecimiento visible de la bacteria.

- Se compararon los valores MIC de ácido 6-acetiltiohexanoico y el ácido hexanoico (MIC 0,04 mM y 0,70 mM, respectivamente). El hidrolizado de PHACOS mostró una
- 30 MIC igual a la del ácido 6-acetiltiohexanoico (MIC 0,04 mM), mientras que el hidrolizado de PHO mostró una MIC de 3mM, similar a la del ácido octanoico. Estos resultados demuestran un efecto inhibitorio del grupo tioéster en el crecimiento de *S. aureus*.

## REIVINDICACIONES

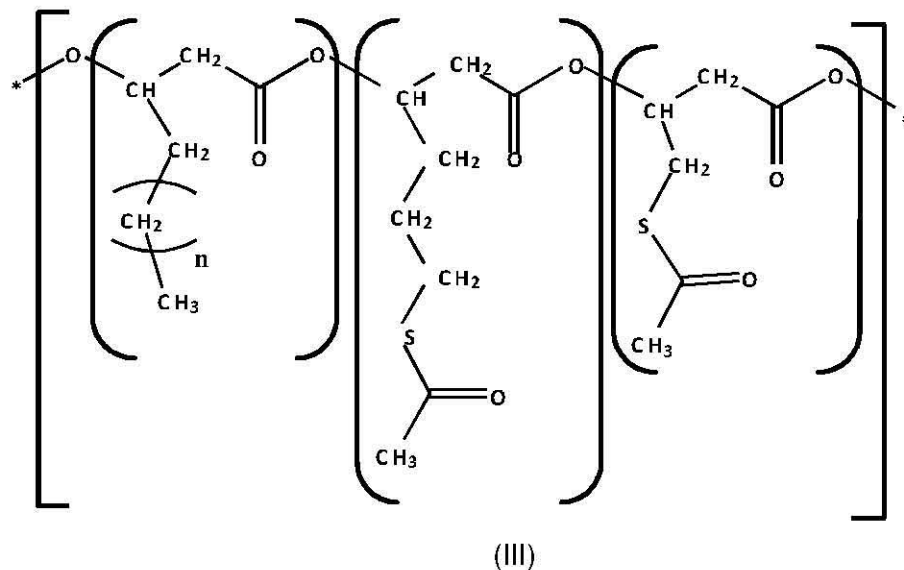
1. Composición bactericida que comprende un polihidroxiaciltioalcanoato, un hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado o cualquiera de sus combinaciones.  
5
2. Uso “*ex-vivo*” de un polihidroxiaciltioalcanoato, un hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado, o una composición bactericida según la reivindicación 1, como bactericida.  
10
3. Uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, un hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado, o una composición bactericida según la reivindicación 1, para la elaboración de un medicamento.
- 15 4. Uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, un hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado, o una composición bactericida según la reivindicación 1, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades bacterianas.
- 20 5. Uso de un polihidroxiaciltioalcanoato, un hidrolizado del mismo, un producto aislado del hidrolizado, o una composición bactericida según la reivindicación 1, para la fabricación de un material bactericida.
- 25 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde la bacteria pertenece al género *Staphylococcus*.
7. Uso según la reivindicación 6 donde la bacteria pertenece a la especie *Staphylococcus aureus*.
- 30 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 donde el polihidroxiaciltioalcanoato es un poli-acetiltiohidroxialcanoato.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 donde los monómeros que forman el polihidroxiaciltioalcanoato son ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9 donde los monómeros del polihidroxiaciltioalcanoato se seleccionan de entre 3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, ácido 3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico, y los derivados hidroxilados de los ácidos 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiobutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiohexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico ó 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 donde el polihidroxiaciltioalcanoato se encuentra formado por un único tipo de monómero.

15

12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 donde el polihidroxiaciltioalcanoato tiene la fórmula (III):



20 donde n tiene un valor entre 1 y 12.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 donde el hidrolizado contiene únicamente ácidos (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoicos.

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 donde un producto aislado del hidrolizado es un ácido (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoico.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde el ácido (*R*)-3-hidroxi-aciltioalcanoico se selecciona de entre el ácido (*R*)-3-hidroxi-6-acetiltiohexanoico, el ácido (*R*)-3-hidroxi-4-acetiltiobutanoico, y los derivados hidroxilados de los ácidos 6-acetiltiohexanoico, 5-acetiltiopentanoico, 2,5-bis(acetilsulfanil)pentanoico, 4-acetiltiobutanoico, 3-acetilsulfanilbutanoico, 11-acetiltioundecanoico, 16-acetiltiohexadecanoico, 5-acetiltiooctanoico, 5-propanoiltiooctanoico, 5-butanoiltiooctanoico, 12-acetiltiododecanoico, 6-acetilsulfanil-8-metilsulfaniloctanoico, 8-acetilsulfanil-6-sulfaniloctanoico, 5-(2-metilpropanoilsulfanil)octanoico ó 6,8-bis(acetilsulfanil)octanoico.

FIG. 1

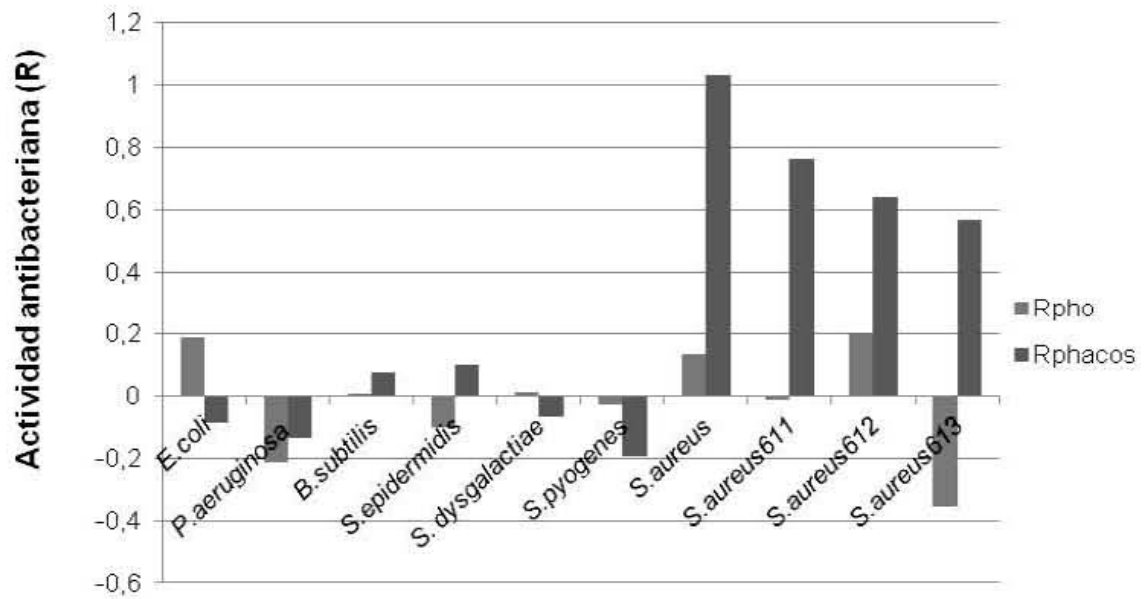


FIG. 2A

